

## 183. 新規抗癌剤の迅速かつ安価な薬効評価実験モデルの開発

横堀 武彦

\*群馬大学 大学院医学系研究科 病態総合外科学

Key words : 腹膜播種, モデル動物, ルシフェラーゼ

### 緒言

近年、動物愛護の観点から実験動物の削減が求められているが、*in vivo*での抗癌剤薬効評価実験などには代替実験が存在しない。ゆえに同一個体での経時的な腫瘍評価が可能かつ、非常に高感度な *in vivo* luciferase assay が注目されている。これまで腹膜播種マウスモデルのほとんどは IVIS system で発光を評価しているが、価格が高額であり多くの研究室に広く普及していない。

そこでわれわれは、luciferase による発光を利用することで実験動物の削減と、これまで評価が不可能だった微小腹膜播種の定量を可能にする安価な新規腹膜播種マウスモデルを作製した。

### 方法

#### 1. 材料と方法

##### 1) Cell line

Mouse colorectal carcinoma cell lines transfected pMSCV-luciferase (colon26-luc) を使用した。

##### 2) Animals

colon26-luc 細胞  $1 \times 10^6$  個を 6-7 週齢 雌 BALB/c マウス (Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan) に腹腔内投与することで腹膜播種モデルを作製した。

##### 3) Luciferase assay and setting:

*in vivo*: マウスはイソフルレン麻酔下にルシフェリンを腹腔内投与し OptimaShot CL-420 a (Wako, Japan) を使用し発光を観察した。

*ex vivo*: Day10 時点での *in vivo* Luc assay 終了後にマウスを開腹し、腸管領域、肝臓領域、後腹膜領域、腹壁領域に分けてルシフェリンを散布し、*ex vivo* Luc assay を施行し、発光スポット (腹膜播種巣) をカウントし定量化した。

##### 4) 使用抗癌剤

CDDP: 10 mg/kg i.p. (Day1 のみ)

Gemcitabine: 240 mg/kg i.p. (Day1 のみ)

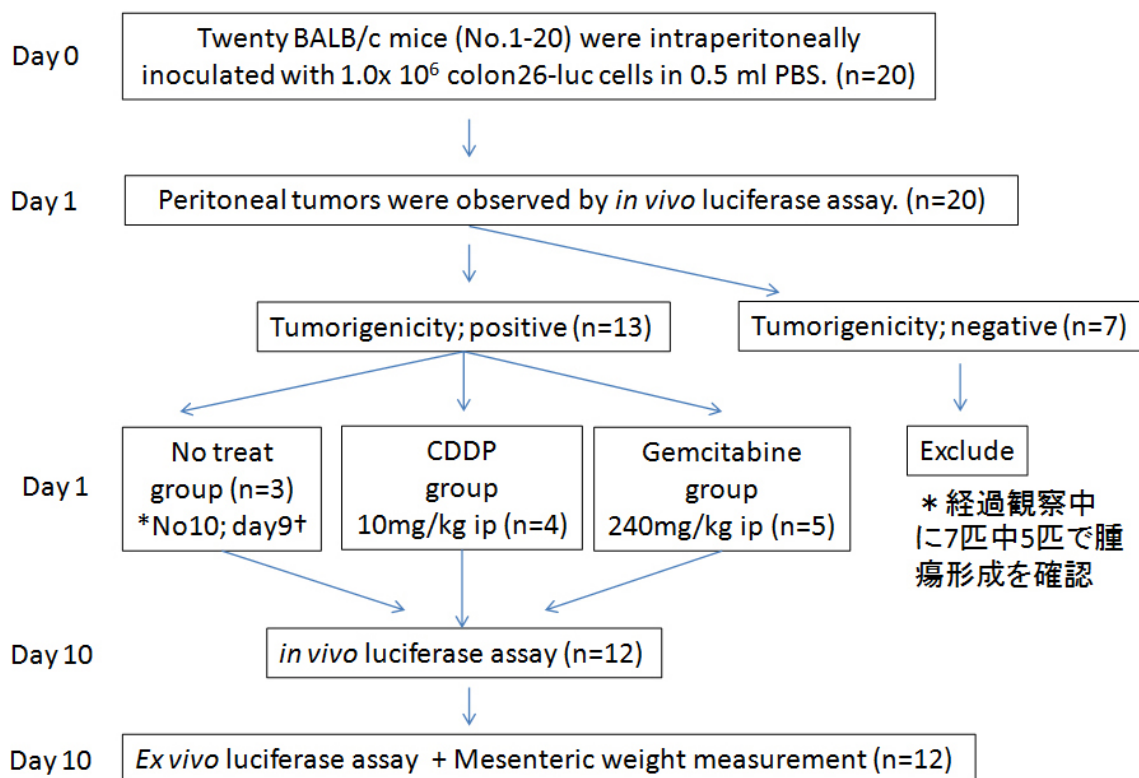


図1. 実験プロトコール<sup>1)</sup>

## 結果および考察

実験プロトコール（図1）に従い20匹のマウスにcolon26細胞を移植（day0）した結果、翌日day1に65%（13/20匹）に播種形成（発光）を確認できた。腫瘍生着を確認出来たマウスにCDDP、Gemcitabineを投与し群分けを行った。day10に薬効評価を行った際にday1に発光を認めたマウスはすべて腹腔内播種巣を形成していた。day10にCDDP群、Gem群の*in vivo* Luc assayを行った結果、抗癌剤投与群で有意に発光強度の低下を認めた。*ex vivo* Luc assayでは肉眼的に腫瘍が確認できない播種巣の数を定量的に評価することが可能であり、抗癌剤投与群で有意に播種巣数が減少していた（図2）。

われわれの開発したルシフェラーゼアッセイを利用した微小腹膜播種巣評価モデルマウスは以下の特徴を有している。

- 1) IVISシステムと比較して非常に安価である。  
⇒同一個体での経時的薬効評価は使用される実験動物の数を減らすため有用な方法。
- 2) 薬剤投与前に播種巣形成の有無を確認できる。  
⇒必要最低限のマウスで信頼性の高いデータを得ることができる。
- 3) 本モデルは従来評価不可能だった不可視の微小腹膜播種巣を定量的に評価可能な腹膜播種モデルである。  
⇒肉眼的に不可視の腫瘍を採取することが可能となる。これにより腹膜播種巣が成立する初期段階での分子生物学的な変化を検討できる。
- 4) 体表からのLuc assayの発光強度が腹膜重量、腹腔内の播種結節数と相関することを確認したモデルであり、正確に腹腔内の病勢を評価可能と考えられる。  
⇒これまでのルシフェラーゼ発現腫瘍細胞を用いたモデル動物では、発光強度が腹腔内の腹膜結節数と相関があるのかを検討したものはない。本検討により体表Luc assayが信頼性の高い腹膜播種巣の病勢、薬効評価法であることが確認できた。

## ex vivo luciferase assayによる発光スポットの確認 (Day10)

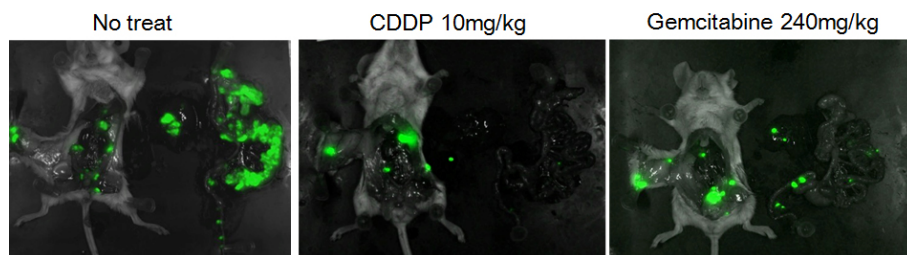


図2. ex vivo Luc assay <sup>1)</sup>

無処理群、CDDP 処理群、Gemcitabine 処理群での ex vivo Luc assay。抗癌剤処理群では治療効果を確認することができた。

## ex vivo luciferase assayによる抗癌剤薬効評価 (Day10)

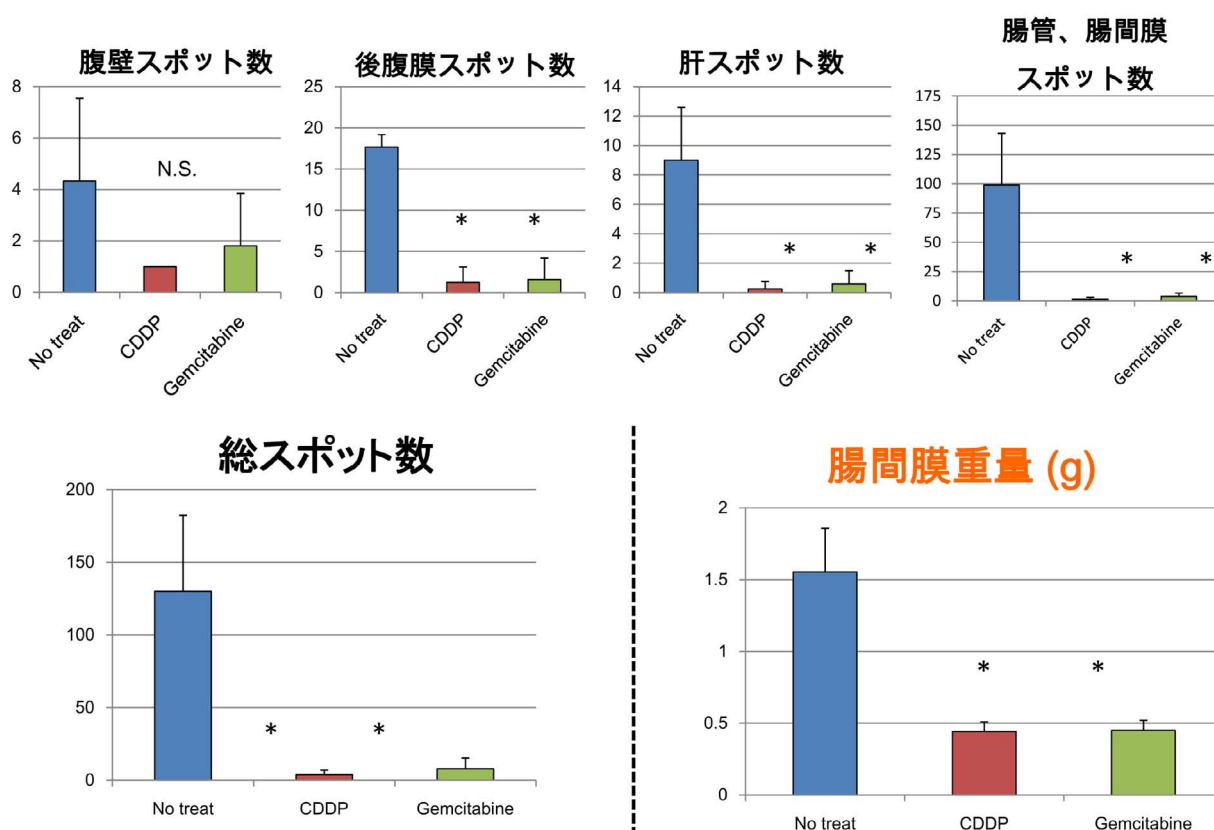


図3. ex vivo Luc assay での腹腔内発光スポット数の定量<sup>1)</sup>

ex vivo Luc assay を使用することでマウス腹腔内に形成された肉眼的に不可視の微小腹膜結節を定量することが可能であった。

# Reports of peritoneal dissemination mouse model evaluated by luciferase assay

|   | Cell line          | Cancer type             | Mouse       | Luciferase assay devices               | Price                     | Substrate                             | Reference                               |
|---|--------------------|-------------------------|-------------|--|---------------------------|---------------------------------------|---|
| 1 | SKOV3              | human ovarian cancer    | Balb/c nude | IVIS system                            | 20,000,000–40,000,000 yen | D-luciferin (150mg/kg) ip             | Yang et al. PLOSone 2011                |
| 2 | CT26               | mouse colon cancer      | Balb/c      | IVIS system                            | 20,000,000–40,000,000 yen | D-luciferin (75mg/kg) ip              | Lan et al., Clin Exp Metastasis 2010    |
| 3 | OV2944-HM-1        | mouse ovarian cancer    | B6C3F1      | IVIS system                            | 20,000,000–40,000,000 yen | D-luciferin 3mg/mouse ip              | Toyoshima et al., Luminescence 2009     |
| 4 | SUIT-2             | human pancreatic cancer | Balb/c nude | IVIS system                            | 20,000,000–40,000,000 yen | D-luciferin 2mg/mouse ip              | Kizaki-Kondoh et al. CCR 2009           |
| 5 | MKN45              | human gastric cancer    | SCID        | IVIS system                            | 20,000,000–40,000,000 yen | D-luciferin 5mg/ml ip                 | Haley et al. J Mol Med (Berl) 2009      |
| 6 | colon26            | mouse colon cancer      | Balb/c      | Night-Owl LB 981Molecular Light Imager | 15,000,000 yen            | D-luciferin 2mg/mouse ip              | Hyoudou et al. Clin Exp Metastasis 2006 |
| 7 | 44As3 and HSC-44PE | human gastric cancer    | Balb/c nude | IVIS system                            | 20,000,000–40,000,000 yen | luciferin 225 $\mu$ g/g ip            | Yanagihara et al. CR 2006               |
| 8 | colon26            | mouse colon cancer      | Balb/c      | CL420 $\alpha$ (Wako)                  | 2,400,000 yen             | D-luciferin 500ug/mouse ip (500ug/ml) | This study                              |

図 4. これまで Luc assay による腹膜播種モデルと本モデルの比較  
本モデルは他のモデルと比較すると安価に *in vivo* Luc assay を導入可能。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は群馬大学病態総合外科 高橋遼、桑野博行および浅尾高行である。

## 文 献

- 1) Takahashi R, Yokobori T, Osone K, Tatsuki H, Takada T, Suto T, et al. Establishment of a novel method to evaluate peritoneal microdissemination and therapeutic effect using luciferase assay. Cancer science. 2016;107(3):341-6. doi: 10.1111/cas.12872. PubMed PMID: 26716425; PubMed Central PMCID: PMC4814254.